# 栽培種及野生種大豆幼胚培養之研究[1]

詹 國 達[2]　　林 富 美[3]

## 一、引　　言

早自 Hanning 氏於 1904 年首先在僅含有礦物質及蔗糖的溶液中，將蘿蔔的胚培育成功以後，不到20年，該項技術竟一躍而爲植物學上的一重要分枝， Rapport (1954) 於硏討各種植物胚培養的貢獻時，得到以下之兩重要結論：(1)它能克服某些種子之某項休眠性性。(2)能得到某些以前認爲不可能獲得之成活雜種種子。前者如 Randolph (1945) 的縮短鳶尾屬種子的休眠性是，後者則更是成就輝煌，如 Blakeslee, Conklin, Van Overbeek (1942), Mclean, (1946), Sanders (1950)等對蔓陀蘿胚培養之成功， Norstog (1956, 1961)，殷 (1961) 等對大麥胚培養成功，雨宮昭、明峰勇夫、島山國山 (1956) 等在水稻胚，Keim (1953), Alice M. Evans (1962)等對三雜草葉種胚； Laibach (1925, 1929) 對亞麻雜種胚；Werckmeister (1934) 對鳶尾屬雜種胚；Brink, Cooper, Ausherman (1944) 等對大麥、黑麥雜種胚；Stone, Duffield (1950) 等對糖松 (Sugar pine) 雜種胚；Konzak (1951) 對大麥、野生大麥雜種胚，Li et al. (1961) 對水稻雜種胚等培養成功的事例，實多不勝枚擧，然在諸多之文獻中，大豆胚之培養工作獨付厥如，而今大豆種間雜種不易獲得，已成爲中外學者進行大豆種緣研究及育種上之共同障碍，極待克服；因之探求栽培種及野生種大豆幼胚可能培養之最早時期及其培養之方法，以供種間雜種胚培養之用，實爲急務。

## 二、研究材料及方法

(一) 研究材料：本研究以大豆栽培種〔Glycine max (L.) Merril〕, 近緣種 (G. ussuriensis) ，野生種 (G. javanica) 及 G. max X G. ussuaiensis 之幼胚供作培養之材料，玆列出其性狀如下：

| 種　　名 | 染色體數目 | 一年生或多年生 | 開花所需日數 | 種子成熟所需日數 | 每莢種子數 | 種子百粒重（克） |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Glycine max | n＝20 | 一年生 | 40–45 | 90–100 | 2–3 | 15–16 |
| G. ussuriensis | n＝20 | 一年生 | 100 | 158 | 2–3 | 12 |
| G. javanica | n＝20 | 多年生 | 132 | 212 | 4–5 | 0.80 |

(二) 培養基種類：主要培養基採用 White's basic medium, 次要爲洋菜蔗糖培養基，及分別加入大豆子葉浸出過濾液等四種，玆列出其主要成分如下：

A. White's basic medium (mg/l.)

| | | | |
|---|---|---|---|
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 360.00 | KI | 0.75 |
| $Ca(NO_3)_2$ | 200.00 | $ZnSO_4$ | 1.50 |
| $NaSO_4$ | 200.00 | $H_3BO_3$ | 1.50 |
| $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ | 16.50 | Glycine | 3.00 |
| $KNO_3$ | 80.00 | Nicotinic acid | 0.50 |
| KCl | 65.00 | Vitamin $B_1$ | 0.10 |
| $Fe_2\ (SO_4)_3$ | 2.50 | V. $B_6$ | 0.10 |
| $MnSO_4$ | 4.50 | Sucrose | 20,000 |

1.本研究曾接受國家長期發展科學之補助，試驗經費由農復會資助，於此一併致謝。
2.3.臺灣省農業試驗所技佐及臨時技術員。

B. White's basic medium 另加入大豆子葉浸出過濾液 5 %

C. 洋菜、蔗糖大豆子葉浸出濾過液培養基：

洋菜 0.7%　　蔗糖 2 %　　大豆子葉液 5 %

D. 洋菜蔗糖加 glycine 等培養基

| | | | |
|---|---|---|---|
| Agar | 8–10 gm/l. | nictinic acid | 1.0 mg/l. |
| glycine | 3.00 mg/l. | ademine | 0.2 mg/l. |
| thiamine | 0.15 mg/l. | Sucrose | 20,000 mg/l. |

㈢ 培養方法：

1. 胚齡之計算：於大豆開花後之首日至第 20 日，逐日將植株中央部位第一分枝至第四分枝上 2～3 節間所開之花掛牌，註明日期，以此爲計算胚齡之標準，即第 1 日至第10日所掛牌之花，其胚齡爲20天～11天，第11日至第20日所掛牌之花，其胚齡爲10天～1天：

2. 胚之剝離及接種：掛牌之豆莢取下後，在 2 %的漂白粉液消毒 1～2 分鐘，次在蒸餾水中冲洗 2～3 次，以備胚之剝離。幼胚之剝離及接種，均在裝有擴大鏡之無菌接種箱內進行。接種後之試管置於 23°～25°C 之培養箱（見圖1-a)）內予以培養，維持24小時之黑暗，第二天以後每天給以14小時之照明，之後定期以擴大鏡檢查幼胚之發育情形，記載其發芽及發根期，待幼苗長大到相當時日後（約爲20～25天），予以移植至普通栽培環境下生長。

3. 培養基之配製：用 1,000 c.c. 之蒸餾水加熱至沸開，慢慢加入藥品，最後徐緩加入 agar，一邊加一邊攪拌，不使成塊，直至成爲 Homogeneous 爲止，此時須注意溶液保持爲1,000 c.c.，不足時可加入蒸餾水補充之。培養液之 PH 值，以 1 %之 KOH 或 IN 之 HCl 調節至 6.0～6.5，裝入(10×3) 公分之試管中，每一試管盛入高約 3 公分左右之培養基，以棉花塞之，然後置於15磅壓力下之殺菌鍋內消毒20分鐘，待冷却後，貯於冰箱中，備接種之用。

## 三、研　究　結　果

實驗一：大豆幼胚培養基種類之選擇及照光試驗。

根據本研究所設定的四種培養基，以胚齡分別爲 20 天及 25 天的二野生種大豆 (G. Javanica) 品系爲材料，同時進行培養基種類之選擇及培養胚需光的試驗。結果（見表一）就培養基種類而言，A, D 二種培養基（即 White's basic medium 及洋菜 thiamin 等培養基）均可使野生種大豆 (G. javanica) 之幼胚發芽，而且可培養胚之發芽率均相當高（33%左右），證明 A, D 二種培養基均爲培養大豆幼胚之優良培養基，可資採用。至於 B, C 二種培養基（即加有大豆子葉浸出過濾液汁的），可能係因子葉汁加入後，其中所含之蛋白質部份有凝固現象，而使培養基無法達至 Homogeneous 狀態，幼胚於培養後均不易發芽，或常變枯黃致死。

接種幼胚需光試驗，共分二處理，一爲接種後24小時內爲暗光 (Dark，以黑布包之) 另一爲接種後24小時照光 (Light) 而二種處理在接種 24小時以後，每日均同樣給以 14小時之照光。結果（見表一）顯示幼胚培養後24小時先予暗光處理的發芽胚數較多，惟此種結果似隨供試品系而有差異，如 G. javanica 之 PI 233051 品系在照光處理時亦有發芽之胚，但 PI 245331 則否。

表一　大豆幼胚培養基種類之選擇及照光試驗（註 1,2）

| 供試品系 | 胚齡（開花後之日數） | 培養基種類 | 照光處理 | 培養胚數 | 培養胚大小mm 長 × 寬 | 幼胚發芽數 | 發芽率 % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| G. javanica PI 233051 (野生種) | 20 | A | Dark | 12 | (1.5～2.6) ×(1.3～1.5) | 5 | 41.6 |
| | | | Light | 12 | | 3 | 25.0 |
| | | D | D. | 12 | | 4 | 33.3 |
| | | | L. | 12 | | 2 | 16.7 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| G. javanica PI 245331 (野生種) | 25 | A | D. | 12 | (1.9~2.4) | 4 | 33.3 |
| | | | L. | 12 | ×(1.4~1.8) | — | |
| | | D | D. | 12 | | 3 | 25.0 |
| | | | L. | 12 | | — | |

註：1. PI 233051 之培養時間：爲2月2日，PI 245331 之培養時間爲：2月22日。
2. B.C. 二種培養基，因全部培養之幼胚均未發芽，故未列入表內。

實驗二：大豆幼胚培養方法試驗。當大豆幼胚所需培養基種類選定後，次一步驟爲研究幼胚之培養方法，亦即採用何等的操作過程，才能促進並增高培養幼胚之發芽率，進而使能移植成活。在培養的一連串操作過程中，最主要的莫如在培養前胚及培養基、接種用器具及接種箱、培養箱（見圖1-a）之完全殺菌消毒，其次是培養胚之完整性（不使在解剖與接種時受傷）及幼胚接種在培養基上之位置，後者不但能決定培養幼胚之是否可發芽，同時亦常因而發生許多不正常的發芽現象，圖 1-b 是幼胚側放在培養基之下，其發芽發根均極爲正常，特別是發根較多，但是由於子葉與培養基緊貼，子葉之頂出及張開，常常遭遇失敗。第二種是將臍及胚根之部份，完全斜向插入於培養基內，則胚之發芽絕大多數均屬正常（如圖 1-c. d.）。第三種是幼胚之胚根部份下埋於培養基內（留出臍之1/3長度在培養基之上）時，其發芽有完全正常者（圖1-e）但亦有不正常之發芽胚（如圖1-f）。

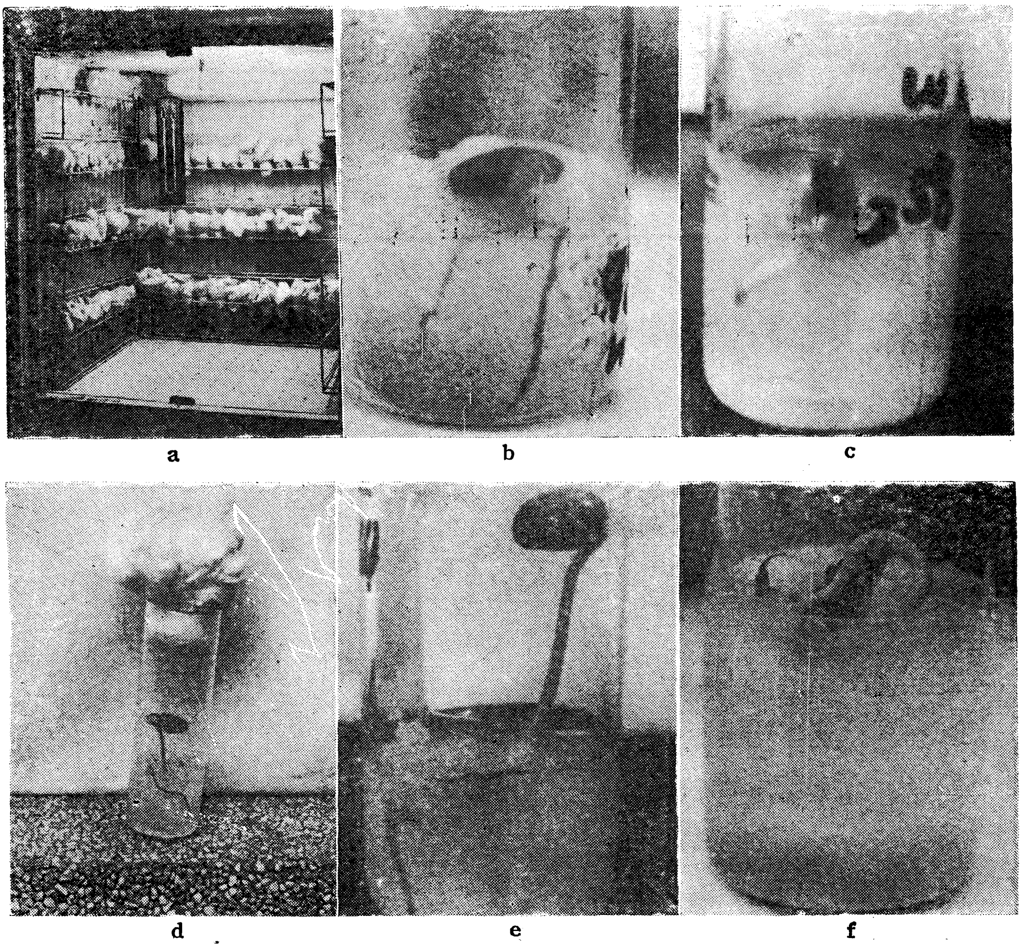


圖1. 大豆幼胚培養用之培養箱及培養胚發芽情形

a. 培養箱　　b.c.d.e. 發芽正常之幼胚　　f. 發芽不正常之幼胚

**實驗三：大豆幼胚可培養之最小胚齡試驗。**

利用幼胚培養方法來克服大豆種間雜種不稔及早期落莢（常在交配10～25天左右落莢）困難時，能培養成功之幼胚胚齡，當爲愈小愈爲有利（減少早期落莢之數目）。關於胚齡之標準，La Rue (1936, 1938) 培養菊、玉米胚之最小培養界限爲 0.5 mm，而雨宮昭等 (1955) 指出開花後 6～9天的水稻幼胚爲培養之可能界限，同氏指出水稻幼胚之胚齡，隨其在穗上之位置有差異，開花日數相同之種子其發育有相當大之差異。大豆之開花自基部第一分枝至第四分枝先開，而分枝上之第 2–3 節上之花爲一枝上最先開之花，與水稻有相似之處，因之爲避免胚齡相同而胚之大小因所在部位相差懸殊的困難起見，本研究除計算胚齡外，並注意取用大小 (Size) 一致之胚爲培養之材料，而所謂胚發芽，是基於其能成爲一幼植物，可以移植者爲標準。

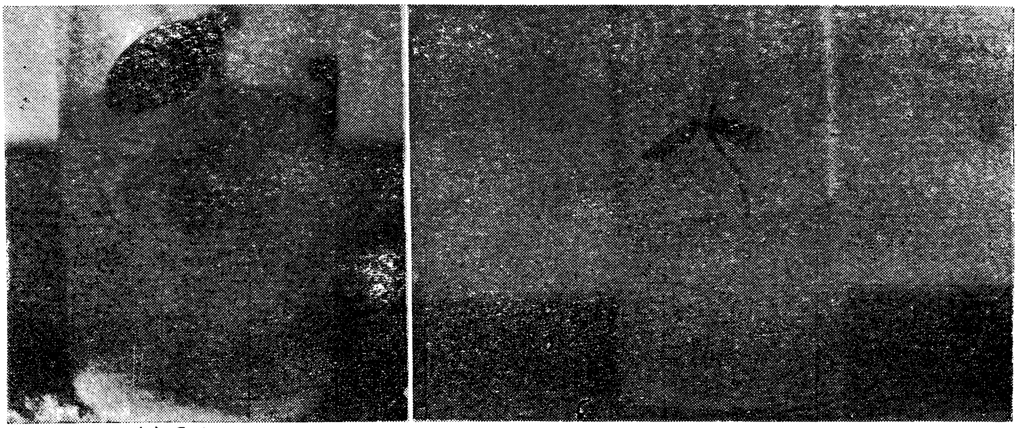
由表二知大豆栽培種可培養之最小胚齡爲 9–10 天（胚之大小平均爲0.34×0.25公分），近緣種，種間雜種及野生種爲 15–20天（胚之大小爲0.25×0.18公分），培養時之溫度爲 23～25°C

表二　大豆屬植物幼胚可培養之最小胚齡

| 培養材料 | 胚齡（開花或交配後之日數） | 接種胚數 | 胚之大小 cm（長×寬） | 發霉胚數 | 子葉枯黃胚數 | 不正常(1)發芽胚 | 不生長(2)胚數 | 正常幼(3)苗胚數 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 栽培種 (G. max) | 3 | 10 | 0.30×0.20 | 4 | 6 | — | — | — |
| | 5 | 13 | 0.33×0.20 | 8 | 5 | — | — | — |
| | 6 | 10 | 0.35×0.20 | 1 | 6 | — | 3 | — |
| | 7 | 16 | 0.37×0.21 | 4 | 7 | 1 | 4 | — |
| | 9 | 24 | 0.37×0.25 | 0 | 16 | 5 | — | 3 |
| | 10 | 32 | 0.45×0.31 | 3 | 14 | 2 | 7 | 6 |
| | 15 | 94 | 0.50×0.36 | 20 | 37 | 7 | 14 | 16 |
| 野生種胚 (G. javanica.) | 3 | 10 | 0.16×0.15 | 3 | 7 | — | — | — |
| | 5 | 10 | 0.20×0.18 | 3 | 4 | — | 3 | — |
| | 6 | 10 | 0.20×0.20 | 4 | 3 | — | 3 | — |
| | 7 | 10 | 0.22×0.20 | — | 6 | 1 | 3 | — |
| | 9 | 13 | 0.25×0.21 | 2 | 5 | — | 6 | — |
| | 10 | 10 | 0.25×0.21 | — | 3 | 1 | 6 | — |
| | 15 | 20 | 0.27×0.22 | 3 | 4 | 5 | 7 | 1 |
| | 20 | 30 | 0.30×0.23 | 6 | 12 | 2 | 2 | 8 |
| 種間雜種 (G.max X G. ussuriensis) | 3 | 10 | 0.20×0.16 | 4 | 6 | — | — | — |
| | 5 | 10 | 0.23×0.18 | 5 | 5 | — | — | — |
| | 6 | 8 | 0.23×0.20 | 2 | 6 | — | — | — |
| | 7 | 10 | 0.25×0.20 | 3 | 7 | — | — | — |
| | 9 | 15 | 0.28×0.23 | — | 8 | — | 7 | — |
| | 10 | 10 | 0.30×0.23 | 2 | 2 | — | 6 | — |
| | 12 | 10 | 0.32×0.24 | 0 | 4 | 3 | 3 | — |
| | 15 | 20 | 0.30×0.26 | 3 | 3 | 3 | 8 | 3 |
| | 20 | 30 | 0.40×0.29 | 4 | 8 | 3 | 10 | 5 |
| 野生種 (G. ussuriensis | 3 | 10 | 0.10×0.10 | 10 | — | — | — | — |
| | 5 | 10 | 0.10×0.10 | 10 | — | — | — | — |
| | 6 | 12 | 0.15×0.10 | 12 | — | — | — | — |
| | 7 | 10 | 0.15×0.13 | 10 | — | — | — | — |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 9 | 10 | 0.18×0.13 | 10 | — | — | — | — |
| 10 | 15 | 0.18×0.13 | 14 | — | — | 1 | — |
| 12 | 15 | 0.20×0.16 | 11 | 1 | — | 3 | — |
| 15 | 20 | 0.23×0.17 | 7 | 4 | 2 | 1 | 6 |
| 20 | 20 | 0.25×0.17 | 4 | 6 | 3 | 3 | 4 |

(1) 多數幼根自培養基內向上生長，如圖 2-a。
(2) 幼根伸出後，停止生長以至死亡。
(3) 幼胚成長可以移植之幼苗，如圖 2-b。

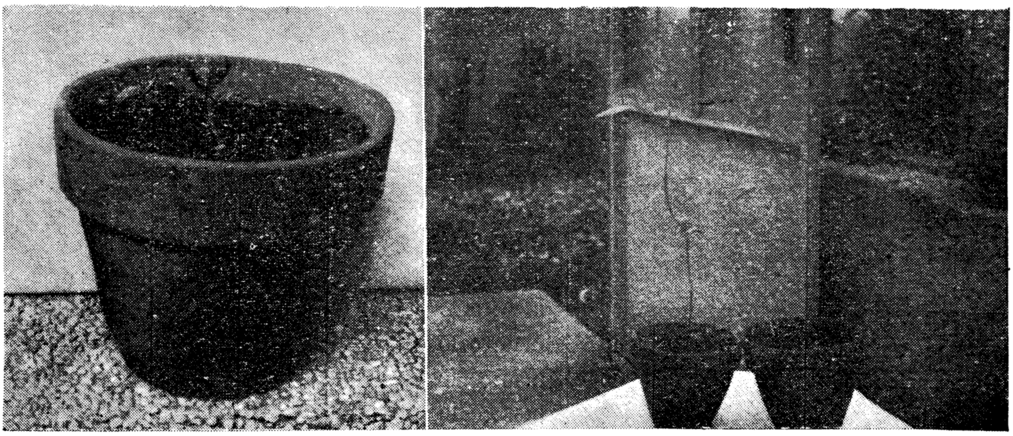


(a) G. max　　(b) G. javanica

圖2. 胚培養不正常 (a) 及正常 (b) 之幼苗

實驗四：胚培養幼苗移植試驗。

大豆幼胚培養之最後目的，是希望在試管內培養出來的幼苗，可以移出來作普通栽培，否則將貶其價値。自培養管中移出作普通栽培之前，(1)有先移至營養成分相同之培養基中 1 ～ 2 次，之後移入消毒砂內，成活後再移作普通盆栽，(2)有由培養管內移至消毒砂內，給以營養分，成活後再移作普通盆栽，在調節幼苗對營養分的適應性而言，移入漸次相近的營養條件下生長，確有必要，但在不使幼苗受傷（特別是幼根）的立場而言，移植次數應該是愈少愈爲有利。因之本實驗在双方兼顧下，進行二種移植法，一是採用後者(2)，一是由培養管內直接移作普通盆栽（圖 3 ）此二法在本實驗中均可移植成功，但似乎直接移植法之幼苗成活機會常大，其原因可能是在第一種方法移至消毒砂時，其營養液之需求與砂之乾濕度難以控制，致使幼苗在移入後 5 ～ 7 天，即告枯萎致死。



a　　b

圖3. 移植成活之培養幼苗

## 四、結 論 及 討 論

本研究藉人工培養方法來培養大豆栽培種(G. max)，野生種 G javanica, G. max X G. ussuriensis 及近緣種 G. ussuriensis 之胚已確屬可能。根據A. Memiya et al (1956)培養水稻幼胚（最小可培養胚齡爲 5～7 天）結果，指出不同型態之水稻品系或系統（如二元體及四元體稻種）間的培養條件，並無顯著差異。而許多他種禾穀類可培養胚之最小胚齡一般均爲 5～10天，（表三）豆菽類如三葉草雜種胚爲12～15天，因之本研究之結果，至少給吾人帶來了「幼胚培養」可以克服大豆屬植物種間雜種不稔之信心，更爲堅强。

表三　各種作物幼胚可培養之最小胚齡

| 作物名稱 | 可培養之最小胚齡 | 研究者 |
|---|---|---|
| 大麥 | 5天 | Harlan and Pope (1922) |
| 大麥 | 7- 8 | 末　次 (1951) |
| 小麥 | 9 | Brenchley (1909) |
| 水稻 | 8-10 | 寺　口 (1928) |
| 水稻 | 6- 9 | 御生園 (1934) |
| 水稻 | 5- 7 | Amemiya et al (1956) |
| 高粱 | 10 | 松　田 (1961) |
| 高粱 | 9-10 | 畢中本、吳大本 (1962) |
| 三葉草 | 12-15 | Evans (1962) |

其次是前人胚培養所用培養基種類甚多，有 Tukey (1933), Randolph and Cox (1943), Olsen (1950), Rijven (1952) 等，各自均認爲是有效之培養基，惟不同作物對培養基成分之用量及種類，有其最適當者，Amemiya (1956) 以 White's basic medium (1943) 進行水稻幼胚培養條件試驗結果，指出氮化合物最適合之含量爲 0.01ml. 而$NO_3$—N較$NH_4$—N 更優，l-tyrosine 氨基酸及 Yeast extract 有促進之效果，但 glycine 對水稻胚之生長無效，更值得注意的是兩種等量的糖（如 glucose 和 sucrose）加入於培養基時，幼胚之生長更佳。因之此等基本問題的研究及其知識之獲得，將成爲大豆屬植物幼胚培養成功的重要因素。

## 五、摘　　要

㈠ 本研究以大豆栽培種 (Glycine max)，近緣種 (G. ussuriensis), 野生種 (G. javanca), G. max X G. ussuriensis 之幼胚培養於White's basic medium及洋菜加thiamin等二種培養基上，培養結果，可培養發芽之最小胚齡，栽培種爲9～10天，近緣種、野生種(G. javanica)及 (G. max x. G. ussuriensis) 爲15～20天。

㈡ 培養發芽之大豆幼苗移植時，以直接由試管移作普通盆栽栽培較爲實用，中間移植似屬不必。

## 參 考 文 獻

1. Jacques Rappaport, 1954, In vitro culture of plant embryos and factors controlling their growth. The botanical review. Vol. XX, No. 4.
2. A. Amemiya, H. Akemine and K. Toriyama, 1956. Bulletin of the National Institute of Agr. Science, Cultural Conditions and growth of immature embryo in rice plant.
3. Evans, Alice M., 1962, Species hybridization in Trifolium. 1. Method of overcoming species incompttibility. Euphytica. Vol. 11, No. 2, pp 115-212.
4. 盧守耕，1961，現代作物育種學，第二十三章第十三節胚之培養法

5. 安田貞雄，1952，栽培學汎論，栽培學實驗法第2章 § 235胚之人工培養，§ 236胚之移植實驗。
6. Kuang-lin Ying, 1961. Studies of growth and development of barely embryos in varies culttivated in vitro.
7. 畢中本、吳大本，1962，科學農業，高梁幼胚培養試驗，第十卷第五、六期。
8. O.T. Bonnett, 1961. Bulletin 672, Uni. of Ill. Agri. Expt. Sta. Embryogeny. pp 93-96.
9. James Bonner and Artther w. Galston, 1951. Principles of plant physiology. chapter 19, The problem of differentiation-embryo growth. pp 440-442.

# STUDYS ON THE METHOD OF EMBRYO CULTURE IN THE CULTIVATED AND WILD FORM SOYBEANS

By

K. L. CHAN AND F. M. LIN

## SUMMARY

The object of the presnt paper was to study how early as possible and, how to culture the immature embryos of soybeans on artifical media. Immature embryos of the species of cultivated soybeans (Glycine max) and wild form soybeans (included G. ussuriensis, G. javanica and G. max X G. ussuriensis) were cultured.

Both media, White's basic medium and another one designated as D, which developed by the auther, were effective for the germination of the immature embryos studied.

The earliest germinative date of the cultured embryos was 9～10 days after anthesis in the species of G. max, and 15-20 days in the species of G. ussuriensis, G. javanica, and G. max X G. ussuriensis. Transference of the seedlings from the medium into soil or first into sand which watered with a nutrient solution, and then into soil, both proved to be sucessful.